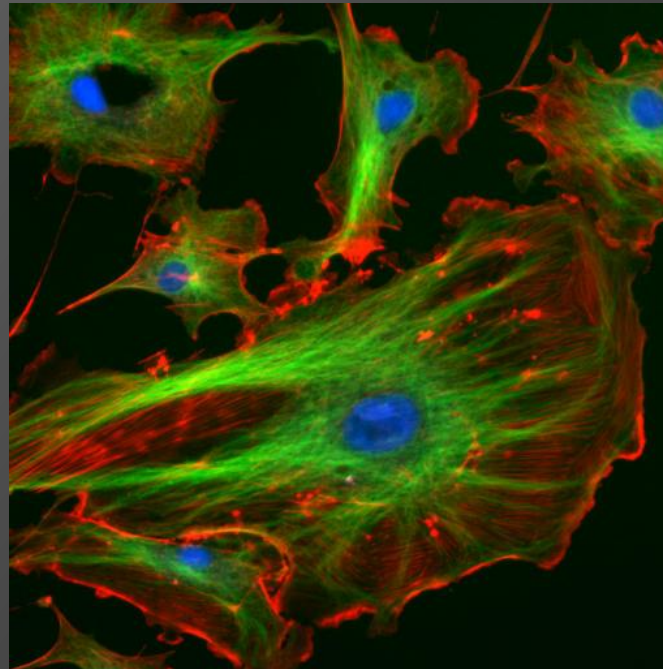


Μέθοδοι μέτρησης μηχανικών ιδιοτήτων κυττάρων και μοντέλα κυτταρικής μηχανικής συμπεριφοράς

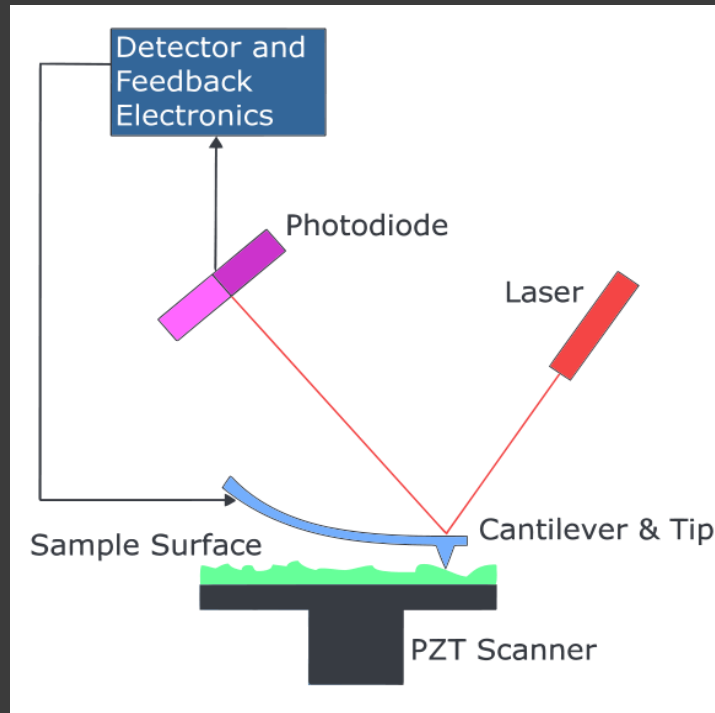


Πετρόπουλος Ηλίας
Σωτηρόπουλος Εμμανουήλ

Μέθοδοι μέτρησης των μηχανικών ιδιοτήτων κυττάρων και βιομορίων

- ⦿ Atomic Force Microscopy (AFM)
- ⦿ Optical Trapping (“optical tweezers”)
- ⦿ Magnetic Bead Microrheometry
- ⦿ Micropipette Aspiration

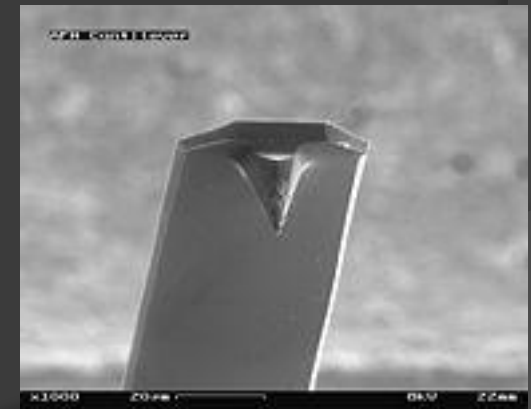
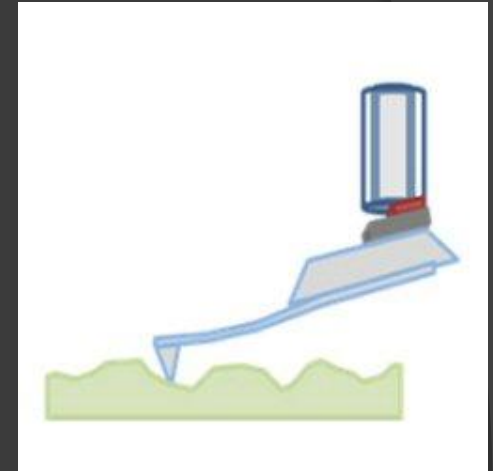
Atomic Force Microscopy



- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υδατικό περιβάλλον κυττάρου ή μορίων
- Η λειτουργία βασίζεται στην ανίχνευση της εκτροπής της ακίδας
- Χρησιμοποιείται κυρίως για χαρτογράφηση του κυττάρου
- Υπάρχουν δύο μέθοδοι: contact και tapping mode

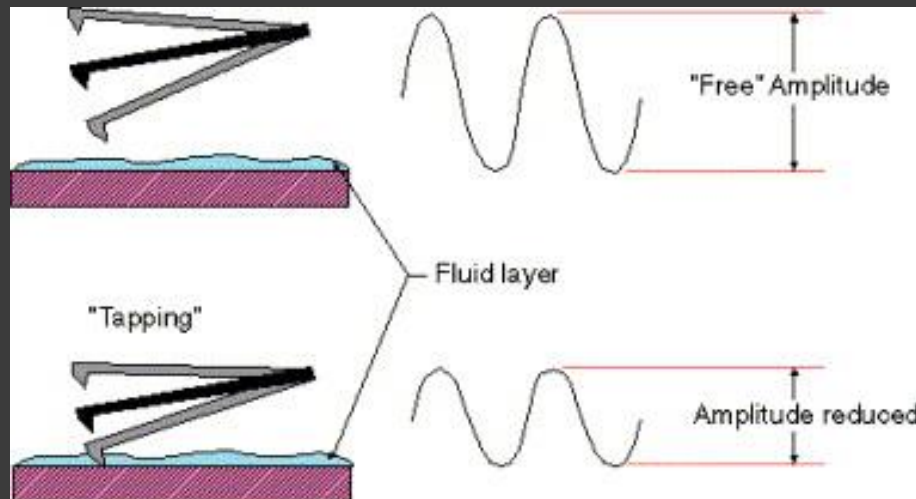
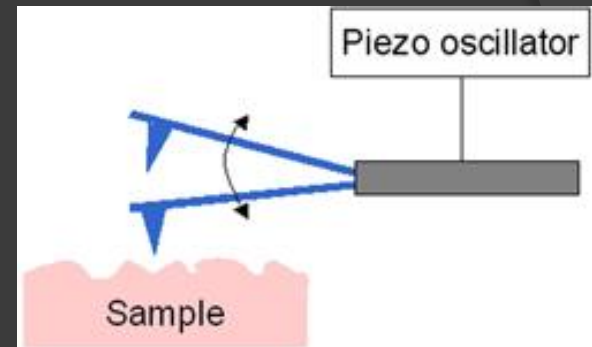
Atomic Force Microscopy – contact mode

- Η ακίδα «σέρνεται» στην επιφάνεια (συχνά με παράλληλη σάρωση)
- Η δύναμη που ασκεί η ακίδα διατηρείται σταθερή μέσω ανάδρασης από το σήμα ανάκλασης που ανιχνεύει η φωτοδίοδος
- Κίνδυνος να τρυπηθεί το κύτταρο
- Χρησιμοποιούνται δοκοί μικρής στιβαρότητας προς αποφυγή θορύβου

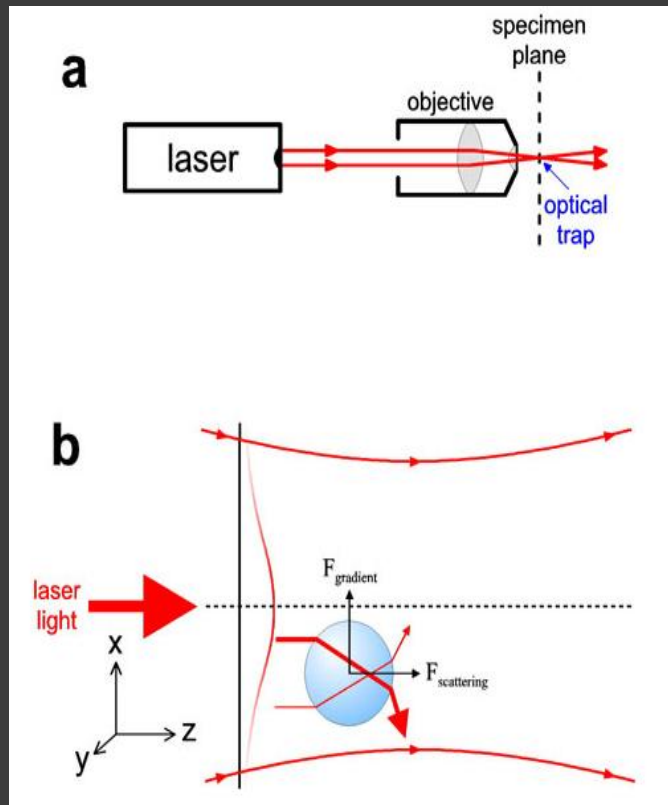


Atomic Force Microscopy–tapping mode

- Η ακίδα ταλαντώνεται κοντά στο δείγμα στη συχνότητα συντονισμού
- Δυνάμεις van der Waals, διπόλου, ηλεκτροστατικές
- Το πλάτος ταλάντωσης μειώνεται καθώς πλησιάζουμε το δείγμα
- Σερβομηχανισμός → σταθερό πλάτος



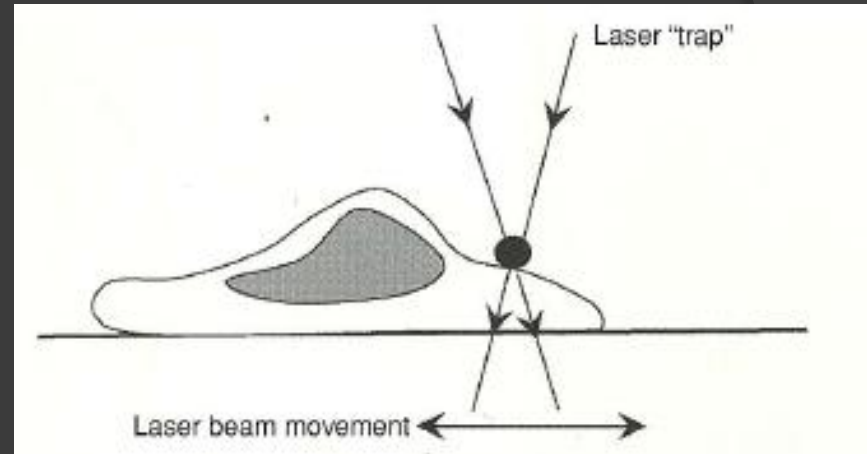
Optical Trapping (“optical tweezers”)



- Εκμεταλλεύεται την ορμή των φωτονίων στην πρόσκρουση της δέσμης φωτός στο σωματίδιο
- Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται είναι σημαντικές για πολύ μικρά σωματίδια

Optical Trapping (“optical tweezers”)

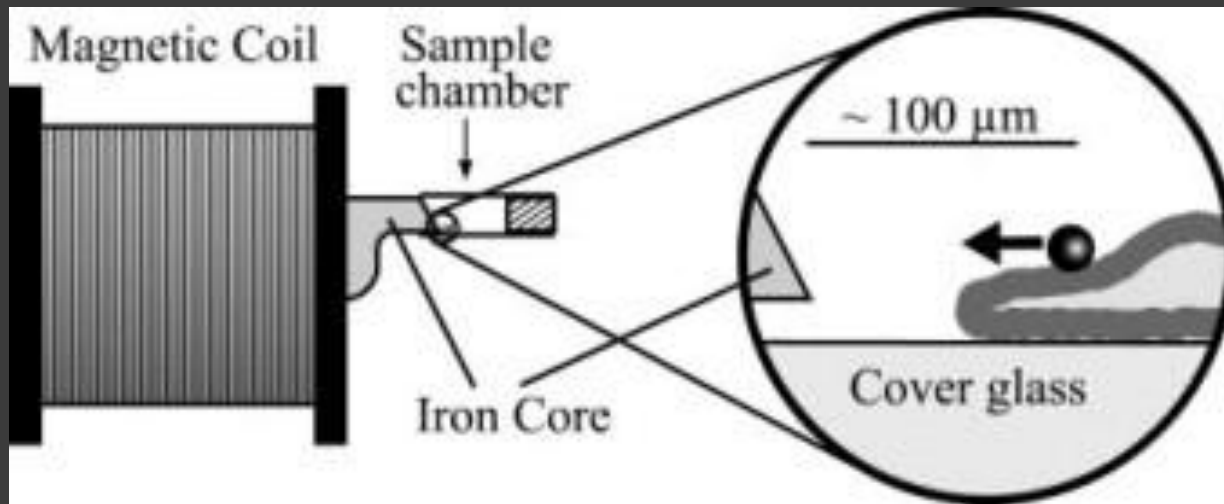
- Με χρήση πρωτεϊνών που αναγνωρίζει το κύτταρο, προσκολλάται σωματίδιο στην επιφάνειά του
 - Η ακτίνα φωτός μετακινείται και μετράται η κίνηση του σωματιδίου
 - Η δύναμη στο σωματίδιο μπορεί να υπολογιστεί
-
- Από τη μετατόπιση του σωματιδίου και τη δύναμη υπολογίζεται η τοπική ακαμψία του κυττάρου



Magnetic bead microrheometry

- Με τον ίδιο τρόπο όπως στη μέθοδο optical trapping, προσκολλάται παραμαγνητικό σωματίδιο στο εξωτερικό του κυττάρου
- Το σύμπλεγμα κυττάρου – σωματιδίου εισάγεται σε μαγνητικό πεδίο
- Από τη μετατόπιση (οπτικό μικροσκόπιο) και τη δύναμη που ασκείται υπολογίζονται μηχανικές ιδιότητες του κυττάρου
- Πλεονέκτημα → μπορούν να εφαρμοστούν υψηλές δυνάμεις ως προς την κυτταρική κλίμακα (100-10000pN)

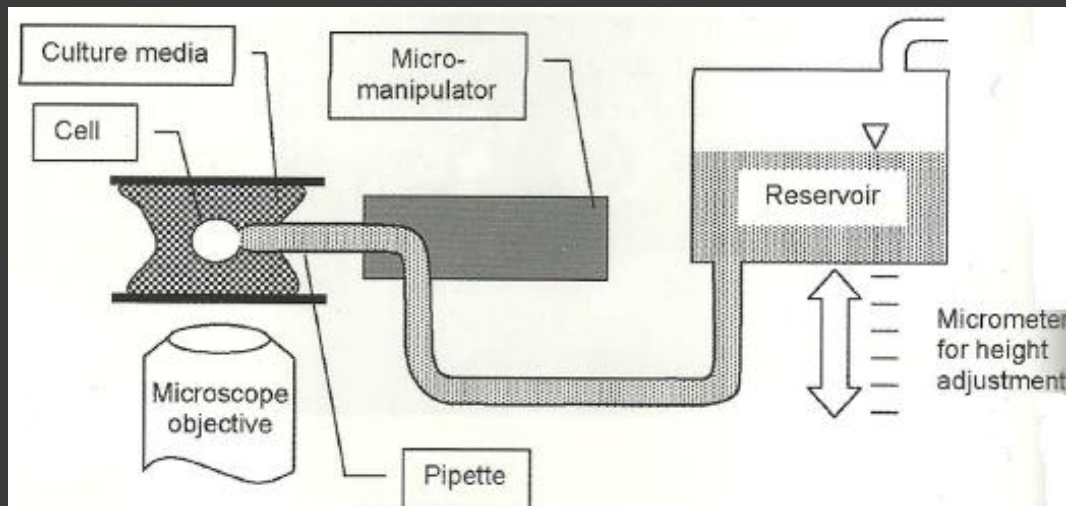
Magnetic bead microrheometry



Σχηματική απεικόνιση της μετρητικής διάταξης

Micropipette Aspiration

- Χρησιμοποιείται μικροπιπέττα διαμέτρου 1-10 μ m
- Το άκρο της προσαρμόζεται σε δεξαμενή ρευστού ελεγχόμενης στάθμης, οπότε εφαρμόζεται ελεγχόμενη πίεση αναρρόφησης
- Δυνάμεις από 10pN έως 10⁴ nN.
- Έχουμε παραμόρφωση κυττάρου χωρίς κίνδυνο καταστροφής (lysis)



Παραδείγματα χρήσης micropipette aspiration: Λευκά αιμοσφαίρια

- Σφαιρική μορφή που οφείλεται στις τάσεις της μεμβράνης, όπως στις σταγόνες του νερού
- Έχουν περίσσεια μεμβράνης που αναδιπλώνεται και σχηματίζει πτυχώσεις
- Για να χωρέσουν σε μικρές διατομές (τριχοειδή αγγεία) παραμορφώνονται σε μακρόστενο σχήμα και η μεμβράνη ξεδιπλώνεται
- Το κυτταρόπλασμα είναι ασυμπίεστο, οπότε με την περίσσεια μεμβράνης μπορεί να αλλάζει σχήμα διατηρώντας σταθερό όγκο
- Οι τάσεις προσομοιώνονται όπως στο εσωτερικό σταγόνων ρευστού με χρήση νόμου Laplace

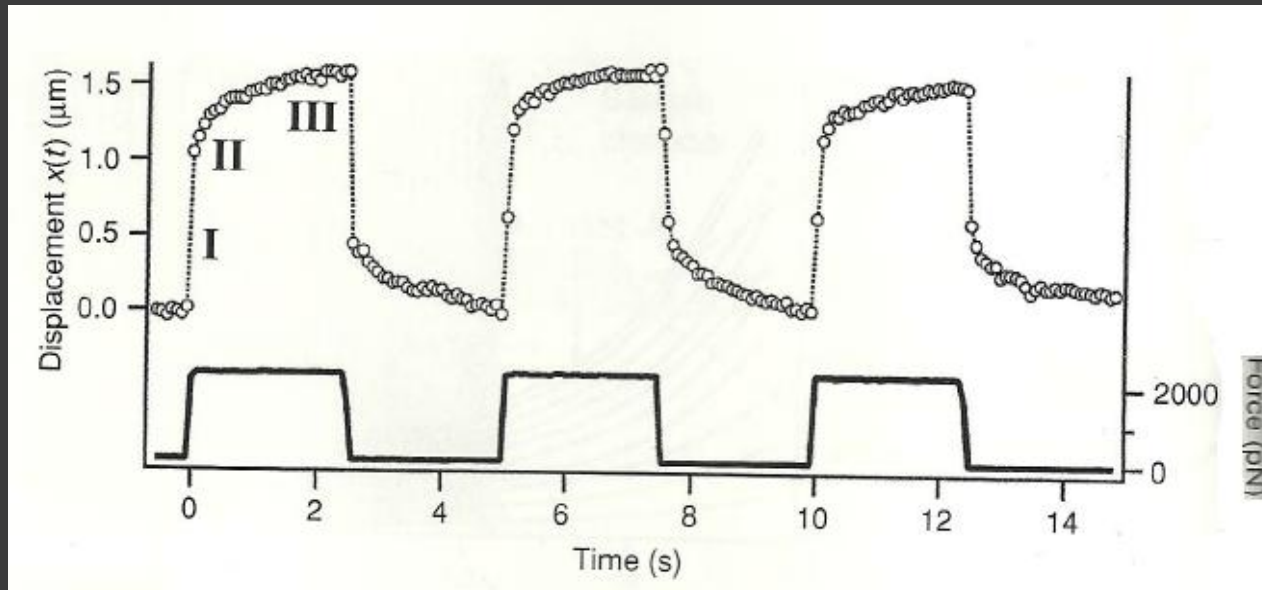
Παραδείγματα χρήσης micropipette aspiration: Ερυθρά αιμοσφαίρια

- Μορφή αμφίκοιλου δίσκου
- Η μεμβράνη αντέχει σε υψηλές καμπτικές παραμορφώσεις χωρίς αύξηση της επιφάνειάς της
- Διατήρηση όγκου (ασυμπίεστο κυτταρόπλασμα)
- Συνδυάζοντας τα προηγούμενα δύο μπορεί να αλλάξει εύκολα τη μορφολογία του
- Μηδενικές τάσεις στο φλοιό
σχήμα αμφίκοιλου δίσκου = free-stress state
- Παρότι πολύ «μαλακά» μπορούν να μετρηθούν με micropipette → σχεδόν γραμμική σχέση aspiration length και πίεσης αναρρόφησης

Μοντέλα κυτταρικής μηχανικής συμπεριφοράς

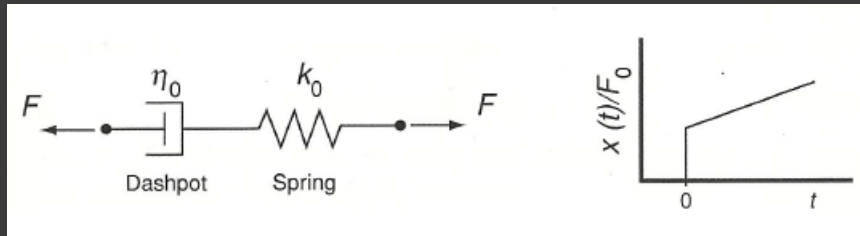
- Lumped parameter viscoelastic model of the cell
- Tensegrity model of the cytoskeleton
- Modeling actin filaments as a foam
- Computational model of a chondrocyte in its matrix

Lumped parameter viscoelastic model of the cell

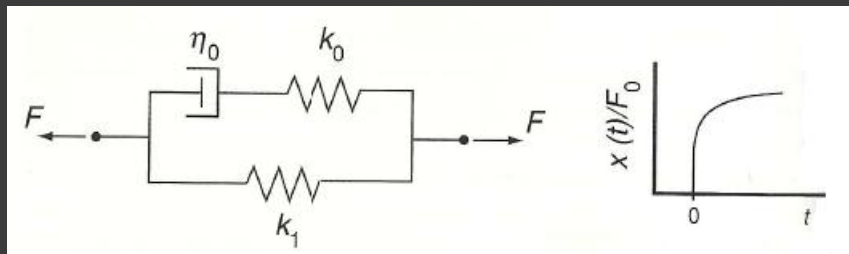


Πειραματικές μετρήσεις από τη μέθοδο magnetic bead για βηματική δύναμη. Το κύτταρο αντιδρά με παραμόρφωση που ακολουθεί τις γνωστές 3 φάσεις της πλαστικής παραμόρφωσης

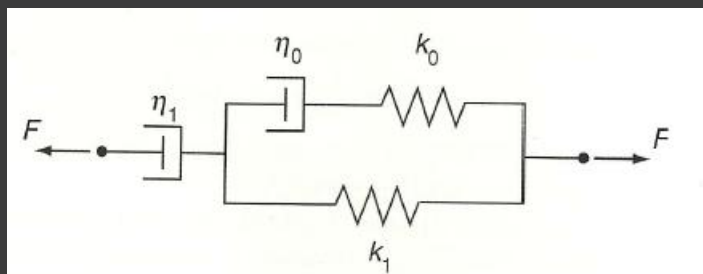
Lumped parameter viscoelastic model of the cell



Μοντέλο Maxwell



Μοντέλο Kelvin

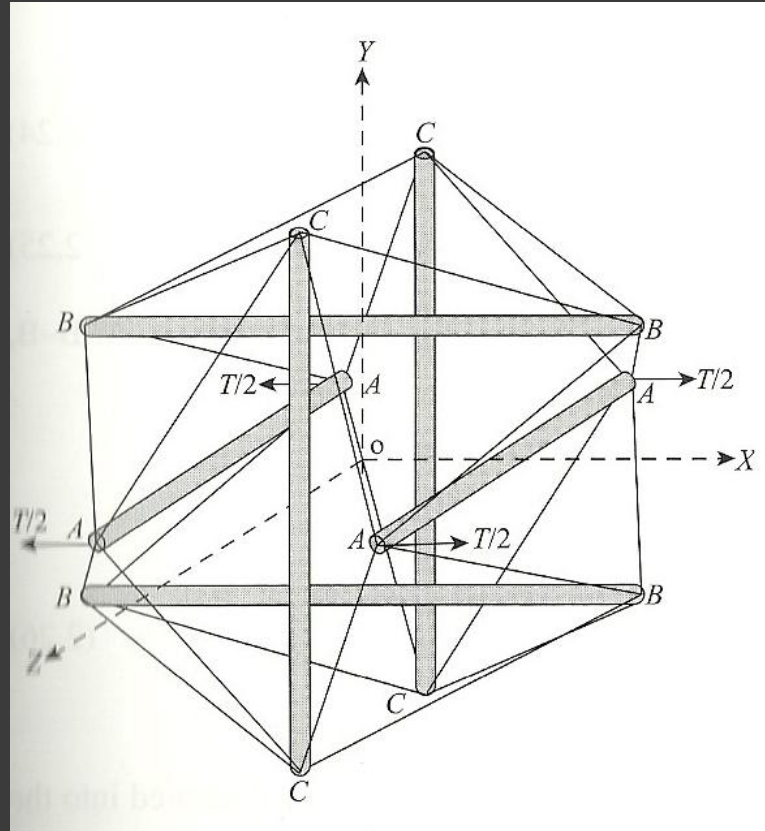


Συνδυαστικό μοντέλο

Tensegrity model of the cytoskeleton

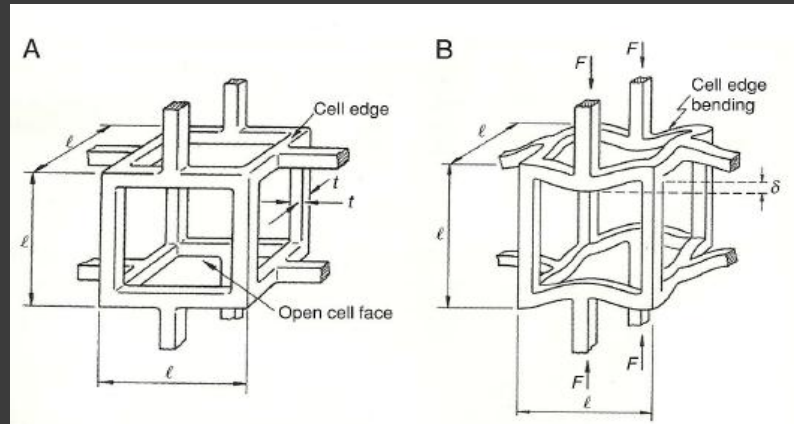
- ⦿ Μηχανικό μοντέλο του κυτταροσκελετού
- ⦿ Tensegrity = tensional integrity → η μηχανική ακεραιότητα του κυττάρου διατηρείται από εσωτερικά στοιχεία, τα οποία υπάγονται σε εφελκυσμό (actin filaments) ή θλίψη (microtubules)
- ⦿ Ιδιαίτερα πολύπλοκη μορφολογία κυτταροσκελετού
- ⦿ Χρησιμοποιείται απλοποιημένο μοντέλο με 6 στοιχεία θλίψης (ελάχιστος αριθμός που δίνει ισοτροπικό σύστημα) και 24 στοιχεία εφελκυσμού
- ⦿ Όταν το στοιχείο βρίσκεται σε ηρεμία, οι τάσεις στα στοιχεία του εσωτερικού δεν είναι μηδενικές

Tensegrity model of the cytoskeleton



Απλοποιημένο tensegrity model με 6 στοιχεία θλίψης και 24 στοιχεία εφελκυσμού

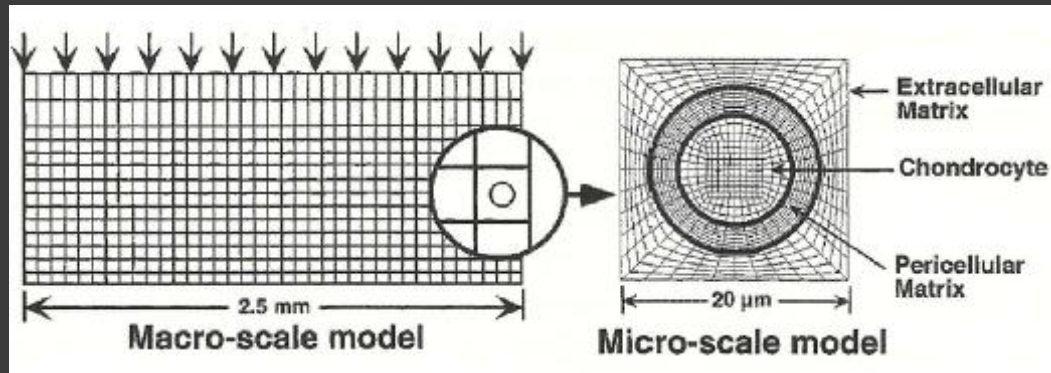
Modeling actin filaments as a foam



- Μηχανικό μοντέλο του κυτταροσκελετού
- Έχει παρόμοια μικροδομή με συνθετικά υλικά, βαμβάκι
- Η μοντελοποίηση δεν περιλαμβάνει το κυτταρόπλασμα στα διάκενα ενδιάμεσα στις ίνες, και δεν περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία του κυτταροσκελετού που μπορούν να δεχτούν φορτία
- Δίνει σημαντικά μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας από τις περισσότερες πειραματικές μετρήσεις

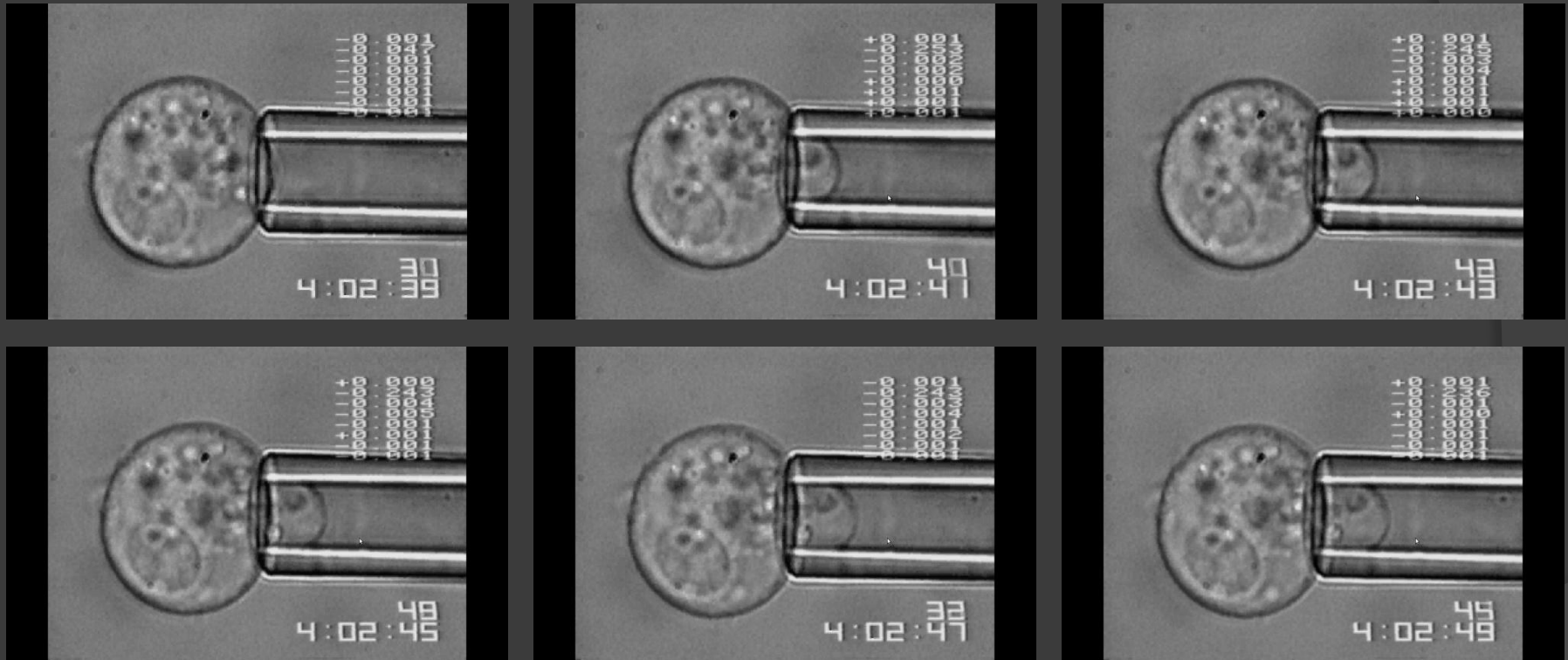
Computational model of a chondrocyte in its matrix

- Μελετά το κύτταρο εντός της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) και όχι απομονωμένο όπως τα προηγούμενα
- Με micropipette aspiration υπολογίζεται το μέτρο ελαστικότητας (αρχικά, σε σταθερή κατάσταση) και η κυτταρική συνεκτικότητα
- Τα δεδομένα εισάγονται σε διφασικό μοντέλο πεττερασμένων στοιχείων



- Τελικά, υπολογίζεται η αντίδραση κυτάρου (μικροσκοπικά) μέσα σε ιστό που δέχεται καθορισμένη συμπίεση (μακροσκοπικά)

Υπολογισμός μηχανικών χαρακτηριστικών κυττάρου με micropipette aspiration

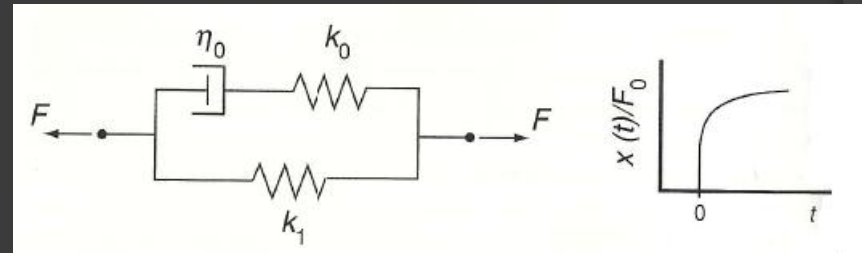


Στιγμιότυπα της πειραματικής μέτρησης του καθηγητή F. Guilak

Υπολογισμός μηχανικών χαρακτηριστικών κυττάρου με micropipette aspiration

Time (sec)	Aspiration length (μm)
0.00	2.0137
1.00	3.0822
2.00	4.1507
3.00	4.7260
4.00	5.0548
5.00	5.2603
6.00	5.4247
7.00	5.5890
8.00	5.6712
9.00	5.7534
10.00	5.8767
11.00	6.0000

Μετρήσεις από στιγμιότυπα



Μοντέλο Kelvin

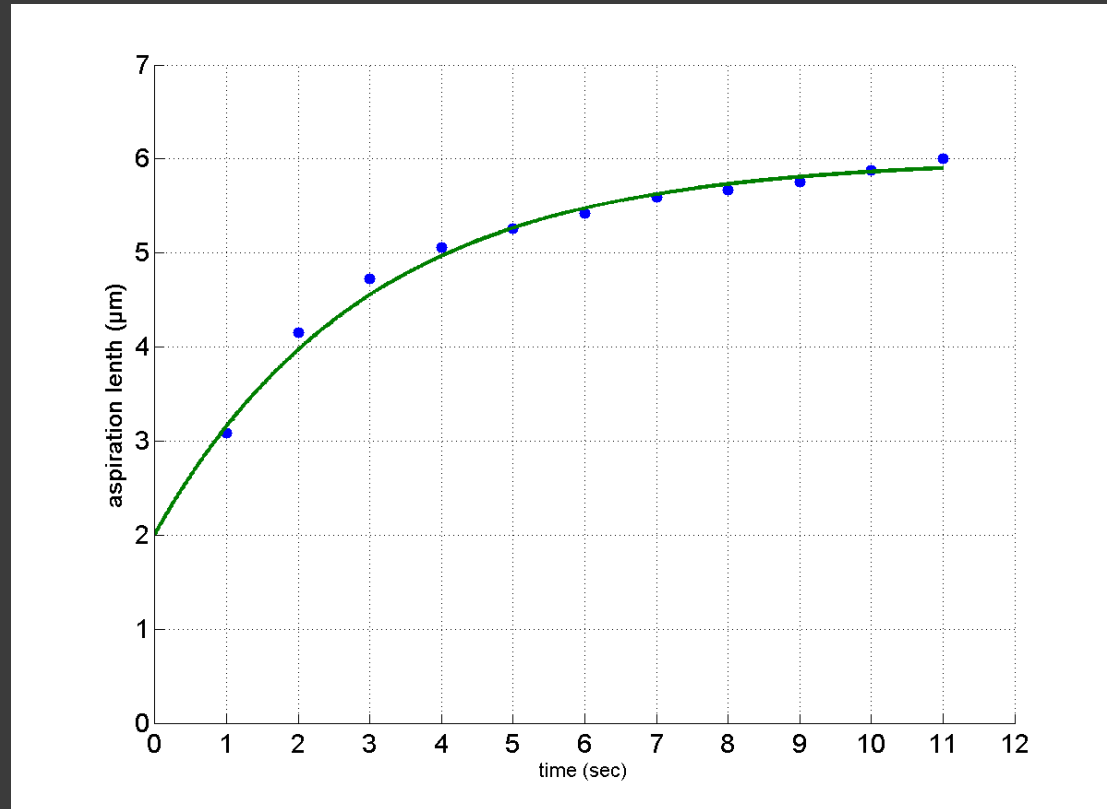
$$\frac{x(t)}{F_0} = \frac{1}{k_1} \left(1 - \frac{k_0}{k_0 + k_1} e^{-t/\tau} \right)$$

όπου τ είναι ο χρόνος χαλάρωσης

$$\tau = \eta_0 \frac{k_0 + k_1}{k_0 k_1}$$

Λύση διαφορικής εξίσωσης συστήματος

Υπολογισμός μηχανικών χαρακτηριστικών κυττάρου με micropipette aspiration



Οι σταθερές του μοντέλου Kelvin του κυττάρου υπολογίστηκαν:

$$k_0 = 725,32 \text{ pN}/\mu\text{m}$$

$$k_1 = 366,38 \text{ pN}/\mu\text{m}$$

$$\eta_0 = 670 \text{ pNs}^2/\mu\text{m}$$